

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-294907
 (43)Date of publication of application : 09.11.1993

(51)Int.Cl.

C07C229/22
 C07C233/47
 C07C251/38
 C07C251/40
 // A61K 31/195

(21)Application number : 04-339118

(71)Applicant : YOSHITOMI PHARMACEUT IND LTD
 TAITO KK

(22)Date of filing : 18.12.1992

(72)Inventor : FUJITA TETSUROU
 SASAKI SHIGEO
 CHIBA KENJI

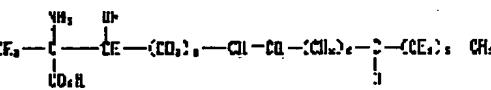
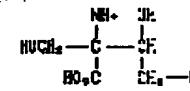
(30)Priority

Priority number : 03356906 Priority date : 24.12.1991 Priority country : JP

(54) 2-AMINOBUTANOIC ACID COMPOUND**(57)Abstract:**

PURPOSE: To obtain new 2-aminobutanoic acid compounds, having excellent immunosuppressive action and useful as an immunosuppressant with hardly any side effects.

CONSTITUTION: The objective 2-aminobutanoic acid compound of formula I (R is alkyl or alkenyl which may be substituted with OH, oxo, hydroxyimino, alkoxyimino, amino or acylamino), its salt, compound protected with a protecting group or isomer thereof, e.g. a compound of formula II. This compound of formula II is obtained by culturing a microorganism of the genus Myriococcum, etc., belonging to ascomycetes or the genus Isaria, etc., belonging to imperfect fungi (e.g. Myriococcum.albomyces ATCC-16425 or Isaria.sinclairii ATCC-24400) capable of producing the compound of formula II which is a starting substance for the other compounds of formula I preferably by an aerobic submerged culture method and collecting the compound of formula II from the resultant culture.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 19.05.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3155099

[Date of registration] 02.02.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-294907

(43)公開日 平成5年(1993)11月9日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 C 229/22		8930-4H		
233/47		7106-4H		
251/38		9160-4H		
251/40		9160-4H		
// A 61 K 31/195	A B C	8413-4C		

審査請求 未請求 請求項の数1(全10頁)

(21)出願番号	特願平4-339118
(22)出願日	平成4年(1992)12月18日
(31)優先権主張番号	特願平3-356906
(32)優先日	平3(1991)12月24日
(33)優先権主張国	日本 (JP)

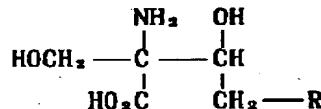
(71)出願人	000006725 吉富製薬株式会社 大阪府大阪市中央区平野町2丁目6番9号
(71)出願人	000204354 台糖株式会社 東京都中央区日本橋大伝馬町7番5号
(72)発明者	藤多 哲朗 京都府向日市鶴冠井町大極殿40番地23
(72)発明者	佐々木 重夫 兵庫県神戸市長田区東尻池新町1番26号 台糖株式会社研究所内
(74)代理人	弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 2-アミノブタン酸化合物

(57)【要約】

【構成】 一般式 (I)



【化1】

化合物(I)

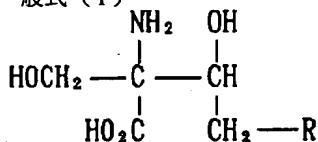
(式中、各記号は明細書に定義されている通りである。)により表される2-アミノブタン酸化合物、その塩、またはその保護基により保護された化合物、あるいはそれらの異性体。

【効果】 本発明の2-アミノブタン酸化合物類は優れ

た免疫抑制作用を示し、ヒト、ウシ、ウマ、イヌ、マウス、ラット等の哺乳動物に対して、例えば臓器や骨髄移植の際の拒絶反応の抑制剤や、自己免疫疾患等における予防または治療剤として、あるいは医学、薬学における試薬として用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(I)



〔式中、Rは水酸基、オキソ、ヒドロキシイミノ、アルコキシイミノ、アミノもしくはアシルアミノにより置換されていてもよいアルキルまたはアルケニルを示す。〕により表される2-アミノブタン酸化合物、その塩、またはその保護基により保護された化合物、あるいはそれらの異性体。

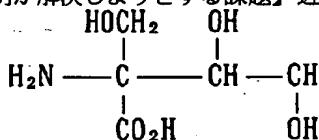
【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、医薬、特に免疫抑制剤として有用な2-アミノブタン酸化合物類に関する。

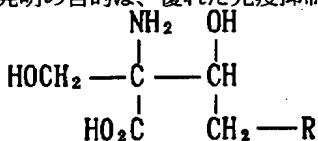
【0002】

【従来技術・発明が解決しようとする課題】近年、臓器



【0005】により表される(2S, 3R, 4R)-(E)-2-アミノ-3, 4-ジヒドロキシ-2-ヒドロキシメチル-14-オキソイコサ-6-エン酸であることが確認されている。さらに、特開平3-128347号公報には同系統の化合物が免疫抑制作用を有することが記載されている。

【0006】本発明の目的は、優れた免疫抑制作用を示



【0009】〔式中、Rは水酸基、オキソ、ヒドロキシイミノ、アルコキシイミノ、アミノもしくはアシルアミノにより置換されていてもよいアルキルまたはアルケニルを示す。〕により表される2-アミノブタン酸化合物(以下、化合物(I)と称する)、その塩、またはその保護基により保護された化合物、あるいはそれらの異性体に関する。

【0010】本明細書中のRで表される基について以下に説明する。アルキルとしてはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、第3級ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシリル、オクチル、2-エチルヘキシリル、デシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、イコシリル、ドコシリル等の炭素数1~30個、好ましくは炭素

【化1】

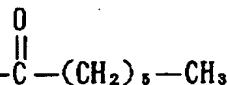
化合物(I)

移植の際に生ずる拒否反応を抑制するためにシクロスボリンが使用されている。開発中の化合物も含めて、いわゆる免疫抑制剤は、さらに関節リウマチ等の治療薬としても期待されてきている。しかしながら、前記シクロスボリンは腎障害等の副作用を生起するという問題点を有している。

【0003】一方、特開平1-104087号公報には、冬虫夏草菌(*Isaria sinclairii*)の液体培養物から免疫抑制物質が採取されることが記載され、当該物質は米国特許第3928572号明細書に開示された式

【0004】

【化2】



し、かつ副作用の少ない新規な2-アミノブタン酸化合物類を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は一般式(I)

【0008】

【化3】

化合物(I)

数1~22個の直鎖または分枝鎖状のアルキルが例示される。

【0011】アルケニルとしては、ビニル、アリル、プロペニル、イソプロペニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、オクテニル、2-エチルヘキセニル等の炭素数2~30個、好ましくは炭素数2~22個の直鎖または分枝鎖状のアルケニルが例示される。

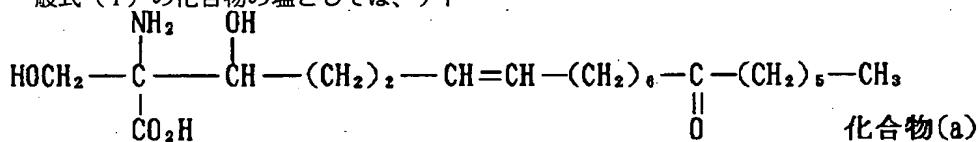
【0012】置換基としてのアルコキシイミノとはメトキシイミノ、エトキシイミノ、プロポキシイミノ、イソプロポキシイミノ、ブトキシイミノ、ヘキシルオキシイミノ等の炭素数1~6個のアルコキシイミノが例示される。

【0013】置換基としてのアシルアミノとはアセチルアミノ、プロピオニルアミノ、ブチリルアミノ、ビバロ

イルアミノ、ベンゾイルアミノ、ニトロベンゾイルアミノ等が例示される。

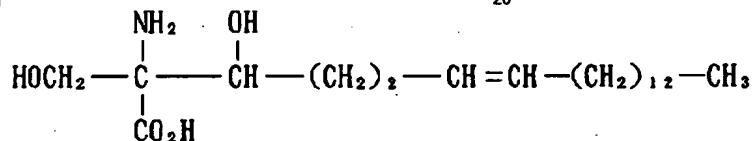
【0014】また、一般式(I)の化合物において、保護基により保護された化合物の保護基とは、カルボキシル基、水酸基またはアミノ基に対し、有機化学上広く用いられるものであって、エステル形成残基(メチルエステル、エチルエステル、ベンジルエステル等)；アセチル、クロロアセチル、トリフルオロアセチル、ベンゾイル等のアシル；第3級ブトキカルボニル、ベンジルオキシカルボニル等のオキシカルボニル；デトラヒドロピラニル、トリメチルシリル、第3級ブチルジメチルシリル等が挙げられる。

【0015】一般式(I)の化合物の塩としては、ナト



【0018】②化合物(b)

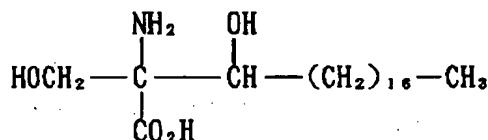
【0019】



化合物(b)

【0020】③化合物(c)

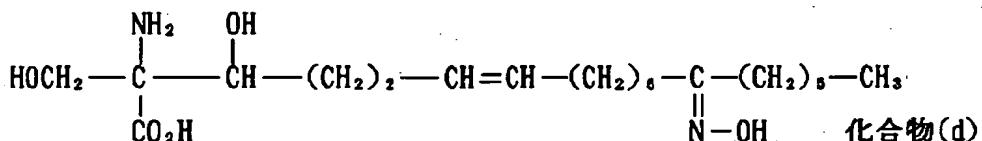
【0021】



化合物(c)

【0022】④化合物(d)

【0023】

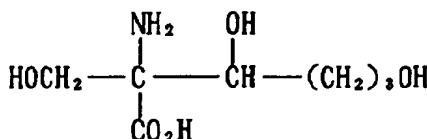


【化6】

【化7】

【0024】⑤化合物(e)

【0025】



化合物(e)

【化8】

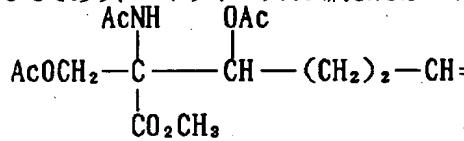
【0026】本発明の化合物(I)は発酵法またはそれにより製造される上記化合物(a)を出発物質として用いることにより製造されうる。化合物(a)を生産しうる微生物としては子のう菌類や不完全菌類に属するも

の、具体的には、不完全菌に属するイザリア属、マイセリア属、子のう菌に属するマイリオコッカム属(チエラピア属)等が挙げられ、それぞれアメリカン・タイプ・カルチュア・コレクション(American Type Culture Col

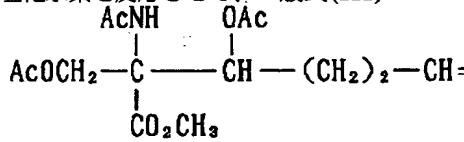
lection)にイザリア・シンクレイリー(Isaria sinclairii) ATCC No. 24400、マイリオコッカム・アルボマイセス(Myriococcum albomyces) ATCC No. 16425、マイセリア・ステリリア(Mycelia sterilia) ATCC No. 20349として寄託されている。また、マイリオコッカム・アルボマイセス ATCC No. 16425は(財)発酵研究所(大阪)にIFO32292として寄託されている。

【0027】化合物(a)は上記菌株を、たとえば常用される紫外線、高周波放射線、薬品等による人工変異手段で変更した変異株にて製造することもできる。化合物(a)生産菌は、通常のかび用栄養源を含む種々の培養基で培養されうる。たとえば、炭素源としてグルコース、澱粉、グリセリン、糖水あめ、デキストリン、糖蜜、マルトース、キシロース等、および窒素源としてコーンスティーピリカー、ペプトン、イーストエキス、ジャガイモ煎汁、肉汁、大豆粉、小麦胚芽、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、カゼイン、グルテンミール、綿実粉、羽毛粉等の無機または有機の窒素化合物が挙げられ、その他通常の無機塩および菌の発育を助け、化合物(a)の生産を促進する有機および無機物や消泡剤等の培養に常用される添加剤を適当に加えることができる。

【0028】培養法は特に限定されるものではないが、好気的な深部培養法が適している。培養に適当な温度はイザリア属に属する菌の場合には20~35℃、好適には25~30℃であり、マイリオコッカム属またはマイ



【0032】(式中、Acはアセチル基を示す。)により表される化合物(以下、化合物(II)という)に亜鉛の存在下、塩化水素を反応させて、一般式(III)



【0034】(式中、Acはアセチル基を示す。)により表される化合物(以下、化合物(III)という)を得、次いで脱保護反応に付すことにより製造される。

【0035】化合物(c)は化合物(III)を、たとえばパラジウム炭素の存在下に水素添加させることにより得られ、次いで脱保護に付すことにより製造される。

【0036】化合物(d)は化合物(a)にヒドロキシルアミンを反応させることにより製造される。なお、化合物(d)に対応するアルコキシム体は、化合物(a)にO-アルキルヒドロキシルアミンを反応させるか、化合物(d)のヒドロキシム体にジアルキル硫酸、ヨウ化

セリア属に属する菌の場合には30~50℃、好適には35~45℃である。

【0029】培養物中に生産された化合物(a)は抽出、吸着等常用される操作を必要に応じて適宜組み合わせ、培養物中より取り出される。たとえば、イザリア・シンクレイリー等のイザリア属に属する菌の場合は培養液から菌体等の不溶物を濾過、遠心分離等の方法で分離し、培養濁液をアンバーライトXAD-2に通液させ、化合物(a)を吸着させることによって取り出される。かくして得られた化合物(a)をさらに、たとえばメタノールで溶出させ、溶出部をさらに逆相クロマトグラフィーにかけて分画することによって化合物(a)の高度精製物が得られる。また、マイリオコッカム・アルボマイセス、マイセリア・ステリリア等のマイリオコッカム属またはマイセリア属に属する菌の場合は、培養液から菌体を濾過、遠心分離等の方法で分離し、培養濁液はイザリア属と同様に操作する。一方、分離した菌体からは、メタノールを用いて化合物(a)を抽出し、抽出液を濁液と同様にアンバーライトXAD-2で処理し、クロマトグラフィーや再結晶により精製し、化合物(a)を得る。

【0030】化合物(b)は化合物(a)の保護基により保護された化合物、すなわち一般式(II)

【0031】

【化9】

化合物(II)

【0033】

【化10】

化合物(III)

40 アルキル等を反応させることによって得られる。また、ヒドロキシム体は常法によりアミン化合物に導くことができる。このアミン化合物にアシル化剤を反応させることにより、対応するアシルアミノ体とすることができる。化合物(d)または対応するアルコキシム体にはアンチー、シナーの幾何異性体が存在するが、本発明はこれら個々の異性体およびそれらの混合物も包含する。

【0037】化合物(e)は化合物(II)をオゾン分解反応に付すか、または酸化オスミウムによる1,2-ジオール形成反応、次いで過ヨウ素酸ナトリウムと反応させ、次いで水素化ホウ素ナトリウム等を用いて還元する

ことにより得られる。

【0038】本発明の一般式(I)の化合物、即ちカルボン酸化合物については、常法により上述した塩とすることができる。また、各種異性体については、ラセミ体、ジアステレオ異性体を光学分割するか、光学活性な原料を用いることによって製造することもできる。

【0039】これらの化合物類は担体、賦形剤、希釈剤等と混合して散剤、カプセル剤、錠剤、注射剤等に製剤化して患者に投与することができる。また自体既知手段にて凍結乾燥製剤としてもよい。これらの化合物類の投与量は疾患、症状、体重、性別、年令等によって変わらうが、たとえば腎移植における拒絶反応の抑制には、通常成人1日当たり0.01～10mg(力価)を1日1～数回に分けて投与される。

【0040】

【実験例・実施例】以下に実験例および実施例を挙げて、本発明の作用・効果をさらに詳細に説明する。なお、免疫抑制の活性測定は下記の方法で行なった。

【0041】当該活性測定法としては、マウス、ラットあるいはヒトのリンパ球を用いた種々の免疫反応を用いることができるが、たとえば免疫抑制活性は、マウス、ラット、ヒトの同種リンパ球混合反応(同種MLR)を用いることにより感度よく測定できる。

【0042】同種MLRとは、同種でしかも主要組織適合性抗原が異なる2個体由来のリンパ球、たとえば脾細胞、リンパ節細胞、末梢血リンパ球等を混合培養することによって誘導されるリンパ球の幼若化反応である。また、同種MLRは、リンパ球の供与者間の主要組織適合性抗原の違いを反映し誘導される現象であり、たとえば一卵性双生児のリンパ球の混合培養によるリンパ球の幼若化現象は認められない。そこで同種MLRは、たとえば臓器移植における供与者-受容者の選択に広く用いられている方法である。

【0043】通常、同種MLRを行なう場合には、一方のリンパ球をX線照射あるいはマイトイシンC処理等を行なうことによって、分裂増殖を阻止した状態で刺激細胞として用い、他方のリンパ球(反応細胞)の幼若化反応を測定する方法(one way-MLR)を用いることができる。

【0044】さらに免疫抑制活性は、同種MLRの際に誘導される主要組織適合性抗原拘束性を有する細胞障害性T細胞の誘導を抑制する活性としても測定することができる。

【0045】また、免疫抑制活性は、同種MLRの他に、種々のマイトイジエン(コンカナバリンA、フィトヘムアグルチニン、ポークウイードマイトイジエン等)の刺激により誘導されるリンパ球の幼若化反応を抑制する活性、またはT細胞、B細胞等のリンパ球の分裂増殖を増強もしくは分化を促進する活性を有するようなサイトカイン(インターロイキン1、2、3、4、5、6

等)により誘導されるリンパ球の分裂増殖反応、または機能の発現を抑制する活性としても評価することができる。さらに、これらサイトカインのT細胞、マクロファージ等からの産生を抑制する活性としても評価することが可能である。

【0046】さらに化合物をマウス等に腹腔内、経口、静脈内、皮内、皮下または筋肉内投与をすることによって、たとえば同種細胞等であらかじめ免疫されたマウスの脾細胞中に誘導される同種細胞特異的細胞障害性T細胞の誘導を抑制する活性、ならびに同種細胞等で免疫したマウスの血清中に產生される同種細胞特異抗体の產生を抑制する活性、または同種マウスの臓器移植の際の拒絶反応、あるいは移植片対宿主反応、あるいは遅延型アレルギー、アジュバント関節炎等を抑制する活性としても評価することができる。

【0047】また、自己免疫疾患のモデル動物であるMRL/lprマウス、NZB/WF1マウス、BXS Bマウス、NODマウス等に化合物を投与することによる、たとえば抗DNA抗体の產生、リウマチ因子の產生、腎炎、リンパ球の増殖異常、尿タンパク等の抑制活性あるいは延命効果としても評価することができる。

【0048】実験例1(マウス同種リンパ球混合反応に対する抑制作用)

マウス同種リンパ球混合反応(以下、マウス同種MLRと称する。)は、反応細胞としてBALB/cマウスの脾細胞を、刺激細胞としてC57BL/6マウスの脾細胞をマイトイシンC処理したもの用い、両者を等比で混合培養することによって行なった。

【0049】反応細胞の調製法としては、以下の方法で行なった。5～6週齢のBALB/cマウスより脾臓を摘出し、熱不活化牛胎児血清(以下、FCSと称する。)を5%添加した RPMI 1640 培地(硫酸カナマイシン60μg/ml、ペニシリンGカリウム100単位/ml、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホネート10mM、0.1%炭酸水素ナトリウム、L-グルタミン2mM含有)を用いて、脾細胞の単細胞浮遊液を得た。溶血処理後、10⁻⁴M 2-メルカプトエタノールおよび10% FCSを含むRPMI 1640 培地を用いて、10⁷個/mlに調製し、反応細胞浮遊液として用いた。

【0050】刺激細胞は以下の方法で調製した。5～6週齢のC57BL/6マウスより脾臓を摘出し、RPMI 1640 培地を用いて脾細胞の単細胞浮遊液を得た。溶血処理後、40μg/mlマイトイシンCで37℃、60分間の処理を行なった。3回洗浄後、10⁻⁴M 2-メルカプトエタノールおよび10% FCSを含むRPMI 1640 培地を用いて、10⁷個/mlに調製し、刺激細胞浮遊液として用いた。

【0051】上述した方法により調製した反応細胞浮遊液50μlと刺激細胞浮遊液50μlおよび10% FCS

Sを含むRPMI1640培地を用いて調製した被検体 $100\mu l$ と、96穴平底マイクロテストプレートに加え、37℃で5%炭酸ガス95%空気の条件下で4日間培養を行なった。

【0052】マウス同種MLRにおけるリンパ球の幼若化反応の測定法としては、 3H -チミジンの取り込みを指標とする方法を用いた。即ち、培養終了後に 3H -チミジン $1.8\text{--}5\text{KBq}/\text{ウエル}$ を添加し、4時間培養

$$\text{抑制率}(\%) = \left[1 - \frac{\left(\frac{\text{被検体を添加した}}{\text{MLRのcpm}} \right) - \left(\frac{\text{反応細胞のみ}}{\text{のcpm}} \right)}{\left(\frac{\text{被検体未添加の}}{\text{MLRのcpm}} \right) - \left(\frac{\text{反応細胞のみ}}{\text{のcpm}} \right)} \right] \times 100$$

【0054】

【表1】

反応細胞	刺激細胞	被検体	用量 (nM)	3H -チミジン 取り込み(cpm)	抑制率 (%)
BALB/c	_____	_____	—	851 ± 291	—
_____	C57BL/6	_____	—	27 ± 22	—
BALB/c	C57BL/6	_____	—	41069 ± 10567	—
BALB/c	C57BL/6	化合物(a)	1	45187 ± 9197	0
BALB/c	C57BL/6	化合物(a)	3	30986 ± 11143	25.1
BALB/c	C57BL/6	化合物(a)	10	9615 ± 597	78.2
BALB/c	C57BL/6	化合物(a)	30	2467 ± 286	96.0
BALB/c	C57BL/6	化合物(a)	100	1293 ± 112	98.9

【0055】化合物(a)について、 1nM から 100nM の範囲の最終濃度でマウス同種MLRにおけるリンパ球幼若化反応活性を測定した結果、表1に示すように、マウス同種MLRに対し抑制作用を示し、 50% 抑制する濃度は $5\text{--}6\text{nM}$ であった。一方、この化合物は、 $10\mu M$ の濃度でもマウスL929細胞に対する細胞毒性は認められなかった。

【0056】実験例2（インターロイキン2（IL-2）により誘導されるIL-2依存性マウスT細胞株CTLL-2の増殖に対する抑制作用）

IL-2依存性マウスT細胞株CTLL-2を 10% FCSを含むRPMI1640培地にて 2×10^5 個/ ml に調製した。この細胞浮遊液 $50\mu l$ と、リコンビナン

後、セルハーベスターにて細胞を収集し、細胞内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定し、マウス同種MLRのリンパ球幼若化の指標とした。マウス同種MLRの抑制活性は、数1の式により抑制率を算出し評価した。また、その結果を表1に示した。

【0053】

【数1】

トヒトIL-2(rh-IL-2)40U/ ml を $50\mu l$ 、および 10% FCSを含むRPMI1640培地を用いて調製した被検体 $100\mu l$ とを96穴平底マイクロテストプレートに加え、37℃、5%炭酸ガス95%空気の条件下で68時間培養を行なった。培養終了後、各ウエルの上清 $100\mu l$ を除去し、 5mg/ml のMTT(3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロマイド)溶液を $20\mu l$ ずつ各ウエルに添加し、4時間、37℃でインキュベートした。その後、 10% ドデシル硫酸ナトリウムを含む 0.01N 塩酸溶液 $100\mu l$ を加え、一晩37℃でインキュベートし、形成された紫色のホルマゾンの結晶を溶解させ、マイクロプレート吸光光度計を用

いて570nmにおける吸光度を測定し、IL-2依存性のCTL-L-2細胞の増殖の指標とした。IL-2依存性増殖の抑制率(%)は次式により算出した。

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{\left[\frac{\text{被検体及びrh-IL-2 を} \\ \text{添加した場合の吸光度}}{\text{rh-IL-2 のみを添加し} \\ \text{た場合の吸光度}} \right] - \left[\frac{\text{rh-IL-2 未添加}}{\text{の場合の吸光度}} \right]}{\left[\frac{\text{rh-IL-2 のみを添加し} \\ \text{た場合の吸光度}}{\text{の場合の吸光度}} \right] - \left[\frac{\text{rh-IL-2 未添加}}{\text{の場合の吸光度}} \right]} \right) \times 100$$

【0058】

【表2】

IL-2	被検体	用量 (nM)	吸光度 (OD ₅₇₀)	抑制率 (%)
-	—	—	0.002 ± 0.005	—
+	—	—	0.876 ± 0.100	—
+	化合物(a)	10	0.715 ± 0.058	18.4
+	化合物(a)	30	0.479 ± 0.038	45.4
+	化合物(a)	100	0.135 ± 0.002	84.8
+	化合物(a)	300	0.084 ± 0.002	90.6

【0059】表2から明らかなように、化合物(a)はIL-2により誘導されるCTL-L-2細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。

【0060】実施例1

(1) 発酵

グルコース(3%)、酵母エキス(0.45%)、K₂HPo₄(0.075%)、KH₂PO₄(0.075%)、MgSO₄·7H₂O(0.05%)を含有する培地(120ml)(pH6.0に調整)を各々500ml容頸長振盪フラスコ20本に入れ、121℃で20分間滅菌した。マイセリア・ステリリアATCC No.20349のポテトデキストロース寒天培地上に成育した菌糸体約1cm²を各培地に接種し、往復振盪機上、40℃で4日間培養した。得られた培養液を予め、121℃で30分間滅菌した200リットルのジャーファーメンターに入れた上記培地組成のものに消泡剤(0.02%)(ダウコーニング社製、商品名「F18」)を添加した培地(150リットル)に接種し、40℃、通気(150リットル/min)、攪拌(200rpm)下にて7日間培養した。

【0061】(2) 化合物(a)の単離および精製

このようにして得られた培養液を濾過して分離した湿菌体をメタノール25リットルで2回抽出し抽出液50リットルを得た。このメタノール抽出液を等量の水で希釈

た、その結果を表2に示した。

【0057】

【数2】

10

【表2】

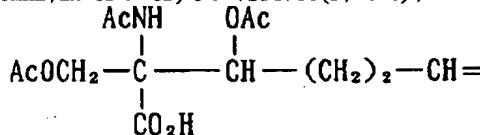
した後、非イオン性吸着樹脂「ダイアイオン HP-20(商品名)」(三菱化成社製)(10リットル)のカラムに通し、70%水性メタノール10リットルで洗浄した後、メタノール(20リットル)で溶出した。溶出液を減圧濃縮し、粉末2.6gを得た。この粉末を、予め50%水性メタノールで充填した「Chromatorex-ODS(商品名)」(富士デビソン社製)(2リットル)を用いたカラムクロマトグラフィーに付した。60%水性メタノール(2リットル)、70%水性メタノール(2リットル)を通液した後、80%水性メタノール(2リットル)で目的化合物を溶出し、減圧濃縮して白色粉末1.5gを得た。さらにこの粉末650mgを、予め65%水性メタノールで平衡化した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用カラム(YMC製、ODS-AM 20φ×250mm、流速8ml/min)へ通し、前記平衡液で溶出した。このクロマトグラフィーは、UV検出器で波長210nmにてモニターし、化合物(a)の検出ピークを分取した。この画分を減圧濃縮し、化合物(a)39mgを白色粉末として得た。

【0062】m.p. 162.0~167.0℃

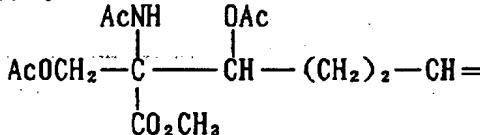
IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹ : 3375, 3275(sh), 3100, 2900, 2850, 1710, 1625, 1580(sh), 1465, 1100, 1050, 970

¹H-NMR (600MHz, in CD₃OD) δ_H: 5.46(1H, br. dt., J=15.4, 6.2Hz, 7-H), 5.41(1H, br. dt., J=15.4, 5.9Hz, 6-H), 3.99(1H, d., J=11.2Hz, 21-H), 3.84(1H, t., J=6.8Hz, 3-H), 3.82(1H, d., J=11.2Hz, 21-H), 2.44 and 2.43(each 2H, t., J=7.2Hz, 13- and 15-Hz), 2.24(1H, br. dtd., J=14.2, 6.7, 5.9Hz, 5-H), 2.01(1H, br. dtd., J=14.2, 7.1, 5.9Hz, 5-H), 1.97(2H, br. q., J=6.2Hz, 8-Hz), 1.54 and 1.53(each 2H, qui., J=7.2Hz, 12- and 16-Hz), 1.53(2H, m., 4-Hz), 1.38-1.24(12H, m., 9-, 10-, 11-, 17-, 18- and 19-Hz), 0.90(3H, t., J=7.1Hz, 20-Hz)

¹³C-NMR (75MHz, in CD₃OD) δ_C: 214.44(s, 14-C), 132.



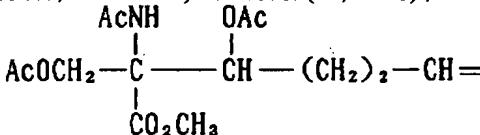
【0065】化合物(a) 20. 1mgに無水ピリジン0. 5mlを加え、室温で激しく攪拌しながら無水酢酸0. 5mlを加えた。化合物(a)が完全に溶解するまで約1時間攪拌を続けた後、攪拌を止め、一夜放置した。反応液に冰水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を1N塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和塩化ナトリウム水溶液で順次洗浄し、乾燥した後、減圧濃縮した。ここで得た残渣1.9mgを酢酸エチル-ヘキサン-蟻酸(7:3:0.1)を展開溶媒とした分取薄層クロマトグラフィーで精製し、化合物(IV) 1.6. 2mgを白色粉末として得た。



【0069】化合物(IV) 1.6. 3mgをエーテル2mlに溶解し、溶液の色が黄色になるまで、氷冷下ジアゾメタンを加えた。30分後、溶媒を留去し、シロップ状残渣を得た。これを酢酸エチル-ヘキサン(1:1)を展開溶媒とした分取薄膜クロマトグラフィーで精製し、化合物(II) 1.5. 0mgをシロップとして得た。

【0070】IR ν_{max} (CHCl₃) cm⁻¹: 3400, 2950, 2850, 1750, 1730, 1680, 1540, 1380, 1240, 1050

¹H-NMR (200MHz, in CDCl₃) δ: 6.47(1H, br.s), 5.4



【0073】化合物(II) 3.0mgを、氷冷下でゆっくりと攪拌しながら、塩化水素ガスを飽和させた無水酢酸1mlに溶解し、次いで活性化した亜鉛末1.40mgを少量づつ2時間にわたり注意深く加えた。亜鉛末を濾別し、さ

07(d, 7-C), 130.63(d, 6-C), 71.01(d, 3-C), 64.71(t, 21-C), 64.71(s, 2-C), 43.53(t, 13- and 15-C), 33.63(t, 8-C), 32.83, 32.70, 30.60, 30.28, 30.22, 30.08, 30.03, 24.92(each t, 4-, 5-, 9-, 10-, 11-, 12-, 16-, 17- and 18-C), 23.60(t, 19-C), 14.39(q, 20-C)

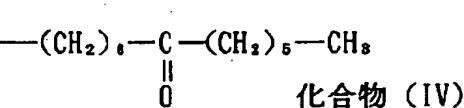
FAB-MS m/z: 386, 340, 75, 57, 45, 31

【0063】実施例2 化合物(b)の合成

(1) 化合物(IV)の合成

【0064】

【化11】



【0066】IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 3400, 2910, 2800, 2550, 1740, 1705, 1690, 1380, 1220, 970

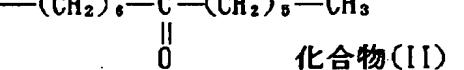
20 ¹H-NMR (300MHz, in CDCl₃) δ: 6.74(1H, br.s), 5.50(1H, t, J=6.5Hz), 5.46-5.26(2H, m), 4.91(1H, d, J=11.5Hz), 4.56(1H, d, J=11.5Hz), 2.40(4H, t, J=7.9Hz), 2.10(3H, s), 2.05(3H, s), 2.04(3H, s), 1.96(4H, m), 1.74(2H, m), 1.56(4H, m), 1.28(12H, m), 0.88(3H, t, J=6.6Hz)

Positive FAB-MS m/z: 512(M+1)⁺

【0067】(2) 化合物(II)の合成

【0068】

【化12】



7-5.22(3H, m), 4.99(1H, d, J=11.5Hz), 4.51(1H, d, 11.5Hz), 3.77(3H, s), 2.39(4H, t, J=7.3Hz), 2.08(3H, s), 2.04(3H, s), 2.02(3H, s), 1.97(4H, m), 1.66(2H, m), 1.55(4H, m), 1.27(12H, m), 0.88(3H, t, J=6.5Hz)

Positive FAB-MS m/z: 526(M+1)⁺

【0071】(3) 化合物(III)の合成

【0072】

【化13】

らに酢酸エチルで洗浄した。濾液と洗液を合わせ、氷水を加えた後、有機層を分離した。水層はさらに酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせ、飽和炭酸水素ナトリウム、飽和食塩水で順次洗浄し、乾燥した。減圧下溶媒を50



留去して得た残渣を酢酸エチル-ヘキサン(7:3)を展開溶媒とした分取薄層クロマトグラフィーで精製し、化合物(III) 23.5mgをシロップ状物質として得た。

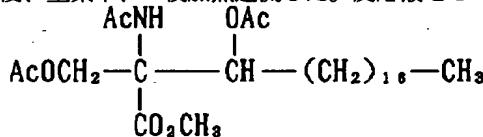
【0074】IR ν_{max} (CHCl₃) cm⁻¹ : 3400, 2910, 1740, 1690, 1500, 1370, 1220, 970

¹H-NMR (200MHz, in CDCl₃) δ : 6.47(1H, br.s), 5.47-5.30(3H, m), 4.98(1H, d, J=11.5Hz), 4.52(1H, d, J=11.5Hz), 3.77(3H, s), 2.08(3H, s), 2.03(3H, s), 2.02(3H, s), 2.01(4H, m), 1.67(2H, q, J=3.6Hz), 1.26(22H, br.s), 0.88(3H, t, J=6.5Hz)

Positive FAB-MS m/z: 512(M+1)⁺

【0075】(4) 化合物(III) → 化合物(b)

化合物(III) 19.7mg (0.05mmol)をメタノール2.0mlに溶解し、1N水酸化ナトリウム溶液0.35mlを加えた後、窒素下、一夜加熱還流した。反応液を1



【0079】化合物(III) 19.9mgをメタノール4mlに溶解し、5%Pd-C 20mgを加えた後、水素下攪拌した。水素の吸収が止まった後、触媒を濾取し、さらにメタノールで洗浄した。濾液と洗液を合わせ、減圧濃縮し、化合物(V) 18.0mgをシロップ状物質として得た。

【0080】IR ν_{max} (CHCl₃) cm⁻¹ : 3375, 2910, 2850, 1740, 1730, 1675, 1380, 1240, 1040

¹H-NMR (200MHz, in CDCl₃) δ : 6.42(1H, br.s), 5.50-5.38(1H, m), 4.99(1H, d, J=11.2Hz), 4.52(1H, d, J=11.2Hz), 3.77(3H, s), 2.09(3H, s), 2.03(3H, s), 2.02(3H, s), 1.25(32H, br.s), 0.88(3H, t, J=6.4Hz)

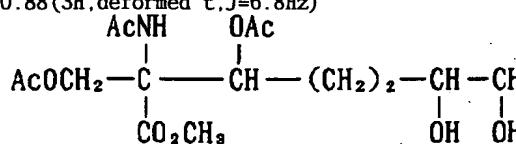
Positive FAB-MS m/z: 514(M+1)⁺

【0081】(2) 化合物(V) → 化合物(C)

化合物(V) 16.7mgを、メタノール2.0mlに溶解し、1N水酸化ナトリウム溶液0.32mlを加えた後、窒素下、一夜加熱還流した。反応液を1N塩酸で中和し、析出した沈殿を濾取した。これをメタノール、次いで水で洗浄し、化合物(C) 7.8mgを得た。

【0082】IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹ : 3380, 3200, 2910, 2850-2500, 1630, 1460, 1100

¹H-NMR (300MHz, in CD₃OD) δ : 3.82(3H, m), 1.56-1.26(32H, m), 0.88(3H, deformed t, J=6.8Hz)



【0087】化合物(II) 35.1mgをピリジン2.1mlに溶解し、室温で攪拌しながら四酸化オスミウム2

N塩酸で中和し、析出した沈殿を濾過した。これをメタノール、次いで水で洗浄し、化合物(b) 10.1mgを得た。

【0076】IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹ : 3400, 3200, 2910, 1660, 1550, 1525, 1465, 1360, 1260, 970

¹H-NMR (200MHz, in CD₃OD) δ : 5.47(1H, br.dt, J=1.5.4 and 6.3 Hz), 5.40(1H, br.dt, J=15.4 and 6.2Hz), 3.95(1H, d, J=11.3Hz), 3.86(1H, d, J=11.3Hz), 3.72(1H, m), 2.27(1H, m), 2.05(1H, m), 1.98(2H, br.q, J=6.3Hz), 1.70(1H, m), 1.40-1.20(17H, m), 0.92(3H, deformed t, J=7.0Hz)

Positive FAB-MS m/z: 372(M+1)⁺

【0077】実施例3 化合物(C)の合成

(1) 化合物(V)の合成

【0078】

【化14】

化合物(V)

20

Positive FAB-MS m/z: 374(M+1)⁺

【0083】実施例4 化合物(d)の合成

炭酸ナトリウム3.0mgを水0.2mlに溶かし、NH₂OH·HCl 3.5mgとエタノール0.3mlを加え、70℃に加温した。この混合液に化合物(a) 19.3mgを加え、同温度で攪拌した。化合物(a)が溶解した後、同温度で6時間放置した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣に水を加え、沈殿を濾取した。この沈殿をメタノールに加温しながら溶かし、室温で放置し、未反応物を回収した。母液より化合物(d) 8.2mgを白色粉末として得た。

【0084】IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹ : 3250, 2950, 2870, 1600, 1470, 1410, 1050, 970

¹H-NMR (200MHz, in CD₃OD) δ : 5.48-5.42(2H, m), 3.94(1H, d, J=11.2Hz), 3.83(1H, m), 3.80(1H, d, J=11.2Hz), 2.32(2H, t, J=7.7Hz), 2.15(2H, t, J=7.6Hz), 1.99(4H, m), 1.53-1.41(4H, m), 1.31(12H, m), 0.90(3H, deformed t, J=6.5Hz)

Positive FAB-MS m/z: 401(M+1)⁺

【0085】実施例5 化合物(e)の合成

(1) 化合物(VI)の合成

【0086】

【化15】

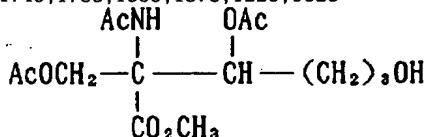
化合物(VI)

0.4mgをピリジン0.2mlに溶解した溶液を加えた後、室温で1時間攪拌を続けた。反応液に亜硫酸水素ナ

50

トリウム41. 8mgを水1. 4mlに溶解した溶液を加え、室温で30分間攪拌した。反応液を水1.4mlに懸濁し、酢酸エチルで抽出した。抽出液を1N塩酸、飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し乾燥した後、減圧濃縮した。この残渣をクロロホルム-メタノール(10:1)を展開溶媒とした分取薄層クロマトグラフィーで精製し、化合物(VI) 34. 5mgをシロップとして得た。

【0088】IR ν_{max} (CHCl₃) cm⁻¹: 3600-3200, 3400, 2910, 1740, 1700, 1500, 1370, 1220, 1020



【0091】化合物(VI) 30. 5mgをジオキサン5. 3mlに溶解し、0. 2M過ヨウ素酸ナトリウム水溶液0. 38mlを加えた後、室温で1時間攪拌した。反応液を濾過し、不溶物を除去した後、濾液を濃縮した。この残渣に水を加え、酢酸エチルで抽出し、その抽出液を濃縮してアルデヒド体をシロップ状残渣として得た。この濃縮残渣をジオキサン2. 5mlに溶解し、さらに水0.

¹H-NMR (200MHz, in CDCl₃) δ : 6.29(1H, br.s), 5.30(1H, t, J=6.6Hz), 4.53(2H, s), 3.78(3H, s), 3.72(1H, m), 3.40(1H, m), 2.39(4H, t, J=7.4Hz), 2.11(3H, s), 2.06(3H, s), 2.02(3H, s), 1.56(4H, m), 1.50-1.23(18H, m), 0.88(3H, t, J=6.5Hz)

Positive FAB-MS m/z : 560(M+1)⁺

【0089】(2) 化合物(VII)の合成

【0090】

【化16】

化合物(VII)

9mlを加え室温で攪拌しながらドライアイス小片を数個加えた。固体が消失したところで水素化ホウ素ナトリウム6. 2mgを加えた。30分後、反応液を1N塩酸で酸性(pH<2)とし、さらに10分後、1N水酸化ナトリウムで中性にして、減圧下濃縮乾固した。この残渣をクロロホルム-メタノール(9:1)を展開溶媒とした分取

フロントページの続き

(72)発明者 千葉 健治

埼玉県入間市小谷田3丁目7番25号 吉富
製薬株式会社東京研究所内